

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan tikus, proses TBI dan pembedahan tikus dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi FKUB. Pembuatan sediaan slide preparat otak tikus dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB. Proses uji IHK HSP70 dilaksanakan di Laboratorium Biokimia FKUB, sedangkan penentuan kadar MDA serum darah tikus dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA UB Malang. Penelitian dilaksanakan bulan Februari – Juni 2017.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 2-3 bulan dengan berat badan antara 300-350 gram, pakan standar, air minum, minocycline, ekstrak kulit manggis.

3.2.2 Bahan kimia

Bahan untuk persiapan TBI dan perawatan pasca TBI (ketamine, xylazin, alkohol 70%, salep gentamicin 10%), bahan untuk pengambilan otak tikus (ketamine dan formalin 10%), bahan untuk pembuatan slide preparat histopatologi jaringan otak tikus (formalin 10%, aseton, xylol, paraffin cair dan paraffin blok). Bahan untuk penentuan kadar MDA adalah larutan stok kit standar MDA, aquades, TCA 10%, HCl 1N, Na-Thio 1%. Bahan untuk analisis HSP70 secara imunohistokimia adalah xylol, etanol absolut, etanol bertingkat (95%, 90%, 80%, 70%, serta aquades), PBS pH 7,4, Hidrogen peroksida 3%, BSA 2%, Antibodi Primer Mouse Anti-HSP70 Monoclonal Antibody, Antibodi Sekunder berlabel Biotin (Rabbit Anti Mouse IgG Biotin Labelled), SA-HRP (*Strep Avidin-Horse Radish Peroksidase*), chromogen DAB (3,3-diaminobenzedine tetrahydrochloride), counterstrain (*Mayer's Hematoxylin*), dan tap water.

3.2.3 Alat penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus berupa bak plastik berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm dengan penutup kandang dan botol minum, timbangan, spuit 1 mL untuk injeksi ekstrak kulit manggis dan minocycline. Peralatan bedah berupa kassa, pinset, gunting needle holder dan catgut untuk persiapan TBI dan perawatan pasca TBI. Silinder beban seberat 40 gram yang dijatuhkan untuk TBI. Gabus dengan ukuran 20 x 20 x 2 cm dengan paper clip untuk papan bedah dan fiksasi tikus pada TBI. Alat fiksator beserta selongsong berbentuk silinder berukuran tinggi 180 cm untuk TBI. Peralatan pengambilan otak dan serum tikus (toples, gunting, alas, jarum pentul), peralatan untuk membuat slide preparat histopatologi jaringan otak (inkubator, gelas objek, cover glass, mikrotom, pinset, automatic processing). Peralatan untuk uji imunohistokimia Hsp70 (mikropipet 20, 200, 1000 μ L, tabung reaksi kecil, rak tabung reaksi, vortex, *cover slip*, *object glass*, *24-well plate*, *6-well plate*, pinset, pipet tetes, mikroskop cahaya, *blue tip*, *yellow tip*, dan buangan untuk media bekas).

3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Persiapan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*)
2. Perlakuan hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model TBI
3. Pemberian terapi ekstrak kulit manggis dan minocycline
4. Pengambilan otak dan serum darah tikus
5. Pembuatan slide preparat histopatologi jaringan otak tikus
6. Pengukuran kadar MDA serum darah tikus
7. Pengukuran ekspresi HSP70 pada otak tikus secara imunohistokimia
8. Prosedur analisis data

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Persiapan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*)

Tikus dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, setiap kelompok terdiri dari 5 tikus. Sebelum diberi perlakuan, tikus diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium selama 7 hari dengan pemberian pakan standar pada semua tikus. Kelompok 1 merupakan

kelompok tikus kontrol negatif yaitu kelompok tikus tanpa TBI dan tanpa pemberian terapi ekstrak kulit manggis ataupun minocycline. Kelompok 2 merupakan kelompok tikus kontrol positif yaitu kelompok tikus model TBI. Kelompok 3 merupakan kelompok tikus model TBI dengan terapi ekstrak kulit manggis dosis 0,5 mL/hari selama 5 hari. Kelompok 4 merupakan kelompok tikus model TBI dengan terapi minocycline dosis 0,5 mL/hari selama 5 hari.

Tabel 3.1 Rancangan kelompok perlakuan tikus

Kelompok	Perlakuan	Ulangan				
		1	2	3	4	5
1	Kontrol negatif					
2	Kelompok positif (tikus TBI)					
3	Kelompok TBI dengan terapi ekstrak kulit manggis dosis sebanyak 0,5 mL/hari selama 5 hari					
4	Kelompok TBI dengan terapi minocycline dosis sebanyak 0,5 mL/hari selama 5 hari					

Sampel penelitian yang digunakan adalah hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) jantan staim wistar dengan berat badan sebesar 300-350 gram. Perhitungan jumlah dari sampel dapat menggunakan rumus Federer sebagai berikut [45]:

$$t(n - 1) \geq 15$$

$$4(n - 1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \text{ (dibulatkan 5)}$$

Keterangan:

t : jumlah kelompok perlakuan

n : jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan estimasi dari sampel di atas, maka untuk keempat kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 5 kali dalam setiap kelompoknya sehingga total jumlah hewan coba tikus yang dibutuhkan sebanyak 20 ekor.

Variable yang diamati dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Variable bebas : perlakuan penjatuhan beban pada otak, dosis terapi ekstrak kulit manggis dan minocycline.
2. Variable terikat : organ otak, serum darah, kadar MDA, ekspresi HSP70.
3. Variabel kontrol : jenis kelamin, umur, berat badan tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar.

Tikus dikandangkan sesuai dengan kelompok perlakuan dan dipelihara pada ruang bersuhu 22-24 °C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup, dimana setiap kandangnya terdiri dari 5 ekor tikus. Kandang tikus terbuat dari bak plastik dengan ukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm yang dilengkapi dengan penutup dari kawat.

3.4.2 Perlakuan hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model TBI

TBI pada hewan coba tikus dalam penelitian ini dilakukan dengan model penjatuhan beban Feeney. Beban dijatuhkan secara bebas dari ketinggian 180 cm di atas kepala tikus yang kulitnya terbuka. Adapun prosedur TBI sebagai berikut [46]:

1. Tikus dianestesi menggunakan ketamine dengan dosis 100 mg/kgBB dan xylazin dengan dosis 10 mg/kgBB melalui injeksi intramuskular pada otot paha.
2. Tikus diletakkan dalam posisi telungkup pada papan bedah dan difiksasi keempat ekstremitasnya menggunakan paper clip.
3. Kepala tikus didesinfeksi menggunakan alkohol 70% dan rambut bagian kepala tikus dicukur.
4. Kulit kepala tikus dibuka dengan digunting dari bagian tengah diantara dua telinga ke arah frontal, hingga tampak bagian tengkorak.
5. Kepala tikus diposisikan berada tepat di bawah selongsong silinder dengan jarak 1 cm untuk menjaga kompresi udara.
6. Silinder besi seberat 40 gram dengan diameter 4 mm dijatuhkan tegak lurus dari ketinggian 180 cm sebanyak 1 kali.
7. Kulit kepala dibersihkan, dijahit kembali, diberikan salep gentamicin 10% topical dan analgesik intramuscular.

3.4.3 Pemberian terapi ekstrak kulit manggis dan minocycline

Terapi ekstrak kulit manggis diberikan pada kelompok perlakuan tiga pasca TBI dengan dosis 0,5 mL/hari selama 5 hari. Sedangkan terapi minocycline diberikan pada kelompok perlakuan empat dengan dosis 0,5 mL/hari selama 5 hari.

3.4.4 Pengambilan otak dan serum darah tikus

Pengambilan otak tikus dilakukan dengan pembedahan. Sebelum dilakukan pembedahan, tikus dieuthanasia menggunakan ketamine dengan dosis 0,2 mL. Setelah tikus tidak merespon, tikus diletakkan pada papan bedah. Selanjutnya dilakukan pemotongan leher belakang tikus atau dipotong searah punggung ke perut seluruhnya sehingga dapat terlihat batas antara tengkorak kepala dan kulit. Kulit kepala tikus di daerah lesi TBI dibuang seutuhnya. Tengkorak tikus digunting seperlunya dari arah perpotongan leher. Tengkorak dibuka dengan kekuatan jari hingga terbuka dan didapatkan penampang otak dan batas-batanya. Secara perlahan, dilakukan pemotongan saraf yang masih terhubung ke otak. Otak dikeluarkan dengan hati-hati dan diletakkan dalam botol organ berisi larutan formalin 10%. Selanjutnya masing-masing sampel otak tikus akan dijadikan slide preparat dan diukur ekspresi HSP70 secara imunohistokimia.

Pengambilan serum darah tikus dilakukan dengan pembedahan. Tikus diletakkan dengan posisi rebah dorsal di atas papan pembedahan. Dibedah pada rongga abdomen. Kemudian, diambil sebanyak 5 mL darah pada bagian vena cava superior jantung dan dimasukkan ke dalam vacutainer berwarna merah. Dipisahkan antara endapan dan filtratnya dengan sentrifugasi 500 rpm selama 10 menit. Kemudian filtrate dipindahkan ke tabung ependolf.

3.4.5 Pembuatan slide preparat histopatologi jaringan otak

Organ otak dipotong dengan ukuran 2 cm x 1 cm x 3 mm. setelah itu, dilakukan fiksasi jaringan otak menggunakan formalin 10% direndam selama 18-24 jam. Sampel kemudian dicuci dengan air mengalir selama 15 menit dilanjutkan dengan dilakukannya tahap dehidrasi menggunakan larutan aseton selama 1 jam sebanyak 4 kali. Setelah itu, dilakukan tahap pembersihan (*clearing*) dengan larutan

xylol selama 30 menit sebanyak 4 kali. Dilakukan tahap pembedaan (*impregnation*) menggunakan paraffin cair dengan suhu 55°C selama 1 jam 4 kali, kemudian dilakukan pengecoran (*blocking*) pada paraffin blok. Dilakukan sayatan pada jaringan yang sudah tertanam dalam paraffin blok menggunakan mikrotom rotary dengan ketebalan 3-5 mikron kemudian diletakkan pada objek glass [47].

3.4.6 Pembuatan kurva standar MDA

Pembuatan kurva standar MDA dilakukan dengan metode sebagai berikut, larutan stok kit standar MDA dengan konsentrasi 1,2,3,4,5,6,7, dan 8 µg/mL masing-masing diambil 100 µL dan dimasukkan dalam *microtube* berbeda yang sudah ditutup dengan aluminium foil. Kemudian, ditambahkan 550 µL aquades dan 100 µL TCA 10%, lalu dihomogenkan. 250 µL HCl 1N dan 100 µL Na-Thio 1% ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Dipanaskan selama 20 menit pada suhu 100°C, kemudian didinginkan dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Filtrat diambil sebanyak 100 µL kemudian diukur dengan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang maksimum ($\lambda_{maks} = 530 \text{ nm}$). Absorbansi larutan diperoleh dan dibuat kurva standar MDA. Kurva standar MDA yang dihasilkan berdasarkan pada persamaan regresi yaitu hubungan antara absorbansi (y) dan konsentrasi (x) [48].

3.4.7 Pengukuran kadar MDA serum darah

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode *Thiobarbituric Acid* (TBA). Pengukuran kadar MDA dimulai dengan serum darah diambil sebanyak 100 µL dimasukkan ke dalam tabung *microtube* yang sudah ditutup dengan aluminium foil dan ditambahkan 550 µL aquades kemudian dihomogenkan. Selanjutnya ditambahkan dengan 100 µL TCA 10% dan dihomogenkan. Ditambahkan 250 µL HCl 1N dan 100 µL Na-Thio 1% dan dihomogenkan dengan vortex. Dipanaskan dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 20 menit. Kemudian didinginkan dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Filtrat dipindahkan ke tabung *microtube* baru. Sampel diukur absorbansinya

dengan menggunakan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang maksimum ($\lambda_{\text{maks}} = 530 \text{ nm}$) [49].

3.4.8 Pengukuran ekspresi HSP70 secara immunohistokimia

Sebelum dideparafinasi slide preparat dipanaskan pada suhu 65°C selama 90 menit. Preparat dideparafinasi dengan xylol selama 3 kali 10 menit, dimasukkan ke dalam etanol absolut selama 2 kali 10 menit. Kemudian dimasukkan dalam etanol bertingkat (95%, 90%, 80%, dan 70% serta aquades) masing-masing selama 8 menit. Slide disimpan semalaman pada suhu 4 °C [50].

Pada hari pertama slide siap untuk di IHK, slide dikeluarkan, ditunggu sampai suhu ruang selama 20 menit. Dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 5 menit. Diteteskan 3% H₂O₂ dalam methanol diinkubasi selama 40 menit, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 5 menit. Diteteskan Antibodi Primer Mouse Anti-Hsp70 Monoclonal Antibody sebanyak 40 μL yang dilarutkan dalam buffer PBS + 2% BSA, diinkubasi semalaman pada suhu 4°C [50].

Pada hari kedua slide preparat dikeluarkan, ditunggu sampai suhu ruang, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 5 menit. Diteteskan Antibodi Sekunder berlabel Biotin (Rabbit Anti Mouse IgG Biotin Labelled) sebanyak 40 μL , diinkubasi 30 menit pada suhu ruang, kemudian dicuci PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 5 menit. Selanjutnya ditambahkan SA-HRP (*Strep Avidin-Horse Radish Peroxidase*) dan diinkubasi selama 40 menit pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 2 kali 5 menit dan dibilas dengan aquadest sebanyak 2 kali . Ditambahkan Chromogen DAB (3,3- diaminobenzidine tetrahydrochloride) dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Dicuci aquadest 3 kali 5 menit. Diteteskan counterstrain (Mayer's Hematoxylin) bersama tap water dengan perbandingan 1:10 dan diinkubasi selama 5-10 menit pada suhu ruang, kemudian dibilas dengan tap water. Dilakukan *mounting cover glass*. Dikeringkan hingga *entellan* kering. Selanjutnya dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop [50].

Ekspresi HSP70 pada jaringan otak tikus dapat dilihat dengan mikroskop potret di Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Univeritas Brawijaya. Preparat diletakkan pada mikroskop dengan perbesaran ocular 10x dan perbesaran obyektif 10x. Setelah terlihat jaringan otak, maka perbesaran obyektif ditambah menjadi 40x.

Pengamatan dilakukan pada 10 lapang pandang yang berbeda supaya hasil yang didapatkan bersifat obyektif. Selanjutnya dihitung ekspresi HSP70 menggunakan immunorasio [50].

3.4.9 Analisis data

Analisis data kualitatif berupa pengamatan ekspresi HSP70 pada otak dan dianalisis secara deskriptif sel-sel yang terekspresi dengan membandingkannya antar perlakuan. Analisa data kuantitatif kadar MDA serum darah tikus dan perhitungan ekspresi HSP70 sebagai marker antiapoptosis sel pada jaringan otak dilakukan secara statistika menggunakan uji sidik ragam *one way analysis of varians* (ANOVA). Selanjutnya dilakukan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau *Tukey* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang nyata dengan tingkat signifikansi 5% menggunakan Microsoft Office Excel dan *statistical package for the social science* (SPSS) version 16.0 for windows 7.